

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Juli sampai Oktober 2008. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimen. Penelitian eksplorasi dengan cara mengisolasi jamur endofit pada daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) yang diperoleh dari dua tempat yang berbeda yaitu dari tepi pantai dan tepi sawah yang ada pada satu desa yaitu Desa Lembung Kecamatan Galis Kabupaten Pamekasan, eksperimen dengan menguji isolat jamur endofit terhadap jamur *C. albicans* dan *A. niger* untuk mengetahui daya antifungi.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar flow cabinet, autoklaf, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, entkas, pinset, kertas saring, incubator, aluminium foil, mikroskop, cover glass, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, pipet

volume, erlenmeyer, penggaris, botol media, shaker incubator, sentrifugasi, timbangan analitik dan silet.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media PDAS (*Potato Dextrose Agar Streptosmycin*), media PDB (*Potato Dextrose Broth*), media PDA (*Potato Dextrose Agar*), larutan NaOCl (*Sodium Hipoklorit*) 1%, daun Mimba (*A. indica* A. Juss), aquades steril, spirtus, kapas, biakan jamur *C. albicans* dan *A. niger*, alkohol 70 %, kertas cakram, tissue dan kapas

3.4 Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah

- 3.4.1 Jamur endofit diisolasi dari daun Mimba (*A. indica* A. Juss) yang diperoleh dari tepi laut dan tepi sawah yang berada di Desa Lembung Kec. Galis Kab. Pamekasan Madura
- 3.4.2 Jamur *C. albicans* yang diperoleh dari Lab. Mikrobiologi Kedokteran Universitas Brawijaya dan *A. niger* yang diperoleh dari Lab. Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat dengan alumunium foil, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media

a. Media PDAS (*Potato Dextrose Agar Streptomycin*), cara pembuatannya sebagai berikut:

1. Menyiapkan bahan yang terdiri dari kentang 1 kg, dekstrosa 20 gram, agar 15 gram, streptomycin 1 gram, dan aquades steril 1000 ml.
2. Memasukkan semua bahan tersebut ke dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen.
3. Kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi.
4. Setelah itu menuangkan larutan PDAS tersebut ke dalam cawan petri dengan ketebalan media ± 5 ml dan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 ml (untuk media miring) dan menutupnya dengan kapas, kemudian didiamkan sampai membeku.
5. Membiarkan media tersebut selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan.

b. Media PDB (*Potato Dextrose Broth*), cara pembuatannya sebagai berikut:

1. Menyiapkan bahan yang terdiri dari kentang 0,5 kg, dekstrosa 10 gram dan aquades steril 500 ml.
2. Memasukkan semua bahan tersebut ke dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen.
3. Menuangkan larutan PDB tersebut ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 ml (untuk media miring) dan menutupnya dengan kapas, kemudian didiamkan sampai membeku.

4. Kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi.
5. Membiarkan media tersebut selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan.

c. Media PDA (*Potato Dextrose Agar*), cara pembuatannya sebagai berikut:

1. Menyiapkan bahan yang terdiri dari kentang 0,5 kg, dekstrosa 10 gram, agar 7,5 gram dan aquades steril 500 ml.
2. Memasukkan semua bahan tersebut ke dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen.
3. Menuangkan larutan PDA tersebut ke dalam tabung reaksi dan menutupnya dengan kapas, kemudian didiamkan sampai membeku.
4. Kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi.
5. Membiarkan media tersebut selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan.

3.5.3 Isolasi Jamur Endofit dari Daun Mimba

Jamur endofit diisolasi dari tanaman Mimba (*A. indica* A. Juss) sehat yang diambil dari daunnya. Bagian daun Mimba tersebut dicuci dengan air mengalir selama ± 5 menit. Setelah pencucian, dilakukan sterilisasi permukaan dengan memasukkannya ke dalam larutan alkohol 70 % selama ± 5 menit, dilanjutkan ke dalam larutan NaOCl (*Sodium Hipoklorit*) 1 % selama ± 5 menit kemudian dikeringkan dengan tissue steril, selanjutnya daun tersebut dibilas dengan

aquadest steril \pm 1 menit diulang dua kali, lalu ditempelkan di atas cawan petri yang berisi media PDAS, perlakuan ini berfungsi sebagai kontrol. Kemudian pada daun yang lain (daun ke-2) dilakukan perlakuan dengan cara memotong sebagian daun secara membujur sebanyak 4-5 potongan tetapi tidak sampai terputus, selanjutnya ditanam pada cawan petri yang berisi media PDAS. Pengamatan dilakukan setiap hari berkisar antara 3-7 hari sampai tampak jamur yang tumbuh. Kemudian jamur endofit tersebut diisolasi dan dimurnikan pada media PDAS baru. Jamur endofit yang digunakan untuk penelitian adalah jamur yang tumbuh pada belahan daun bagian dalam (Indriana, 2005).

3.5.4 Pemurnian Jamur Endofit

Medium yang digunakan untuk pemurnian jamur endofit yaitu medium PDAS. Jamur endofit yang tumbuh pada medium PDAS, dimurnikan masing-masing pada medium plat dan media miring PDAS. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 25 °C, setelah inkubasi dilakukan pengamatan terhadap bentuk dan warna koloni pada medium PDAS. Setiap koloni yang berbeda bentuk maupun warnanya disubkultur lagi pada medium PDAS baru.

3.5.5 Identifikasi Isolat Jamur Endofit

Jamur endofit yang telah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 25 °C tadi diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis. Pengamatan ciri-ciri makroskopis dengan cara langsung melihat bentuk dan warna koloni jamur endofit. Sedangkan pengamatan ciri-ciri mikroskopis dengan menggunakan mikroskop binokuler.

Pembuatan preparat untuk pengamatan yang menggunakan mikroskop binokuler adalah sebagai berikut:

1. Media agar diambil dari cawan petri dengan jarum ose
2. Potongan media tersebut diletakkan di atas obyek glass
3. Konidia atau spora dari biakan murni jamur diambil dengan jamur ose
4. Inokulum jamur diletakkan di atas potongan media pada obyek glass.
5. Obyek glass ditutup dengan cover glass kemudian ditekan secara perlahan
6. Preparat tersebut diletakkan di atas tissue basah yang diletakkan di atas penampakan plastik dan di inkubasi selama 3-4 hari
7. Morfologi jamur (bentuk dan ukuran hifa, konidia, spora) yang terbentuk diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x, kemudian Preparat jamur diidentifikasi dengan menggunakan buku identifikasi jamur karangan Barnett (1972).

3.5.6 Seleksi Jamur Endofit Penghasil Metabolit Antifungi

a. Produktivitas Metabolit Antifungi

Produksi metabolit antifungi yang dihasilkan oleh jamur endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium PDB. Koloni jamur endofit yang telah diinkubasi pada medium PDAS selama 24 jam pada suhu 25 °C, diambil satu sengkelit dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke medium PDB cair dalam Erlenmeyer 50 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 25 °C menggunakan shaker incubator 130 rpm selama 48 jam. Setelah selesai, masing-masing medium disentrifugasi dengan kecepatan 2000 g pada suhu 4 °C selama

20 menit. Supernatan diambil dan dipergunakan dalam pengujian aktivitas antifungi terhadap jamur *C. albicans* dan *A. niger*

b. Uji Antifungi Terhadap Jamur *C. albicans* dan *A. niger*

Medium yang digunakan untuk uji aktivitas antifungi yaitu medium PDA. Uji aktivitas antifungi metabolit jamur endofit terhadap jamur *C. albicans* dan *A. niger* dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dan membuat bulat dengan alat pelubang kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam supernatan kultur jamur endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktivitas antifungi (medium PDA). Kemudian diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37 °C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran diameter zona jernih yang terbentuk. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antifungi ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih.

3.6 Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan sebagai berikut: mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat adalah diameter yang tidak ditumbuhi oleh jamur di sekitar paper disk dikurangi diameter Paper disk.